

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ikan lele merupakan salah satu sumber protein pangan asal hewan yang banyak dikonsumsi dan dibudidayakan di Asia khususnya Bangladesh, Cina, Myanmar, Thailand, Kamboja, Sri Lanka dan Indonesia (Needham dan Funge-Smith, 2014). Indonesia sendiri jenis ikan lele yang sering dikonsumsi dan dibudidayakan ialah ikan lele afrika (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) karena kemampuan dan ketahanannya sehingga dapat dibudidayakan dalam kepadatan yang tinggi membuat spesies ini menjadi salah satu pemeran kunci dalam penyedia sumber protein pangan asal perikanan budidaya air tawar selama bertahun-tahun di Indonesia (Hastuti dan Subandiyono, 2018). Ikan lele memiliki berbagai keunggulan seperti pertumbuhan yang cepat dan kemampuan bertahan hidupnya yang tinggi sehingga potensi lele berhasil panen juga akan tinggi (Sudarmawan et al., 2023).

Saat ini usaha budidaya ikan lele sudah menjadi sebuah bentuk usaha yang banyak ditekuni masyarakat karena proses yang mudah dalam budidaya serta potensi yang bisa terus dikembangkan seperti produk-produk pangan yang berbahan dasar ikan lele contohnya bakso, salai ikan lele, kerupuk, cemilan ikan lele dan lain sebagainya sehingga menjadikan ikan lele sebagai salah satu komoditas perikanan yang prospektif untuk dibudidayakan baik dalam skala industri ataupun skala rumah tangga (Anashrullah dan Yusuf, 2021). Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) mencatat, produksi ikan lele di Indonesia mencapai 1,12 juta ton dengan nilai Rp22,24 triliun pada tahun 2022. Volumennya naik 5,03% dibandingkan setahun sebelumnya yang mencapai 1,07 juta ton senilai 18,94 triliun, hal ini menunjukkan adanya tren positif dalam budidaya di Indonesia (Mustajab, 2024).

Namun salah satu faktor permasalahan yang harus dihadapi dalam kegiatan budidaya ikan adalah serangan wabah penyakit yang dapat disebabkan oleh faktor internal tubuh ikan itu sendiri seperti genetik, imunodefisiensi serta gangguan metabolik dan faktor eksternal seperti kondisi lingkungan yang tidak mendukung, pakan dan organisme patogen yang dapat menyebabkan ikan stres sehingga sistem pertahanan tubuhnya menurun dan mudah terserang penyakit (Afrianto et al., 2015). Penyakit ikan yang disebabkan oleh bakteri patogen menjadi salah satu faktor kritis yang dapat menghambat usaha budidaya karena infeksiya dapat menyebabkan kematian pada ikan yang sering kali menimbulkan kematian ikan dalam jumlah yang besar dan dalam kurun waktu singkat (Rumondang et al., 2022).

Adapun agen penyakit yang seringkali menyebabkan kematian pada ikan lele afrika (*C. gariepinus*) adalah *Aeromonas hydrophila* yang merupakan bakteri patogen penyebab penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS) atau dikenal dengan aeromoniasis (Mulia dan Vauziyyah, 2021). Zhang et al. (2020) dalam penelitiannya menyatakan bahwa bakteri *A. hydrophila* sangat mempengaruhi usaha budidaya ikan air tawar karena kemampuannya yang dapat berkembang

dengan sangat cepat di kolam yang hanya dari beberapa individu (5–15%) menjadi seluruh kolam (hingga 100%) dalam beberapa hari dan seringkali menimbulkan wabah penyakit dengan tingkat kematian yang tinggi (80-100%) dalam kurun waktu yang singkat (1-2 minggu). Selain itu, Berdasarkan penelitian dari Baumgartner et al. (2017) menuturkan bahwa, bakteri *A. hydrophila* merupakan patogen utama dari wabah penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS) pada ikan lele di pertambakan yang mengakibatkan tingginya angka kematian pada ikan lele berukuran konsumsi yang siap dijual dipasaran.

A. hydrophila merupakan mikroorganisme akuatik yang berada di perairan laut maupun perairan tawar, dalam kondisi stres bakteri tersebut menjadi patogen dan bersifat oportunistik, fakultatif, oligotrofik serta menyebabkan pendarahan hebat, eksoftalmia, lesi yang dapat berkembang menjadi ulkus nekrotik dan kegagalan organ pada ikan yang biasa disebut penyakit *Haemorrhagic septicemia* (penyakit bercak merah) (Rasmussen-Ivey et al., 2016). Lesi kemerahan pada daerah mulut, pangkal sirip, dubur, perdarahan dan pengelupasan pada kulit serta lesi putih keabu-abuan yang meluas menjadi tanda khas yang ditimbulkan oleh penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS) (Semwal et al., 2023).

A. hydrophila bersifat Gram-negatif, oksidase-positif, anaerobik, dapat hidup pada suhu 22-32°C serta menghasilkan faktor virulensi seperti α dan β hemolisin, aerolisin, adhesin, enterotoksin, fosfolipase dan lipase (Semwal et al., 2023). *A. hydrophila* bertransmisi melalui kontak langsung dengan ikan yang terinfeksi, pakan yang terkontaminasi serta dari lingkungan ke inang. Fluktuasi suhu dan pH serta kondisi lingkungan yang buruk akan mempengaruhi aktivitas metabolisme bakteri *A. hydrophila* secara signifikan sehingga dapat berproliferasi dan berkembang biak dengan sangat cepat yang menyebabkan kekebalan inang terganggu dan menciptakan kondisi yang menguntungkan untuk menyebar secara sistemik (Abdella et al., 2024).

Ikan yang dipapar *A. hydrophila* setelah diteliti dapat mengalami kerusakan hepatosit, edema dan infiltrasi leukosit pada jaringan parenkim, hemosiderosis dan perdarahan akut pada organ dalam. Lesi patologis terdeteksi di limpa, lambung, usus, insang, ginjal, dan hati. Pemeriksaan histopatologi menunjukkan perubahan degeneratif, nekrosis, edema luas, dan inflamasi pada organ dalam. Hati yang terinfeksi menunjukkan agregasi limfositik dari pembuluh darah menuju sel hati yang nekrosis. Sel yang mengalami nekrosis akan mengganggu fungsi organ yang terdampak (Abdelhamed et al., 2017). Maka dari hal tersebut, peneliti akan melakukan analisis histopatologi organ hati untuk melihat kerusakan jaringan dan sel yang ditimbulkan

Kerusakan hati dapat dianalisa melalui histopatologi dengan melihat tingkat kerusakan hati meliputi pada derajat dan luasnya perubahan dengan menggunakan skor mulai 0-6 yaitu (0): tidak terjadi perubahan, (2): akut, ditandai dengan Infiltrasi sel radang (neutrofil), degenerasi lemak dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah, (4): sedang, terjadinya kongesti dan hemoragi, (6): parah, jaringan dan sel mengalami nekrosis (Jabbar et al., 2021).

Selain melihat gambaran histopatologi, peneliti juga melakukan analisis parameter biokimia dalam aliran darah, analisis tersebut juga digunakan pada ikan sebagai indikator stres fisiologis dan kerusakan jaringan. Indeks parameter biokimia memberikan informasi luas tentang kapasitas potensi kekebalan tubuh, tingkat stres dan penyakit. Peningkatan kadar parameter biokimia fungsi organ hati dalam plasma darah menunjukkan adanya gangguan fungsi hati dan kerusakan hepatoseluler (Fazio, 2019).

Belum ada yang meneliti pengaruh yang ditimbulkan oleh bakteri *A. hydrophila* secara akut terhadap histopatologi serta 10 parameter kimia darah fungsi organ hati secara komprehensif yaitu Albumin (ALB), Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), Alkaline phosphatase (ALP), Gamma-glutamyl transferase (GGT), Total bilirubin (TB), Total bile acids (TBA), Total protein (TP), Total cholesterol (TC), dan Globulin (GLOB) untuk mempresentasikan kerusakan dan gangguan fungsi organ hati pada ikan lele afrika (*C. gariepinus*) sehingga penelitian ini dilakukan untuk memberi pengetahuan baru terkait dampak yang ditimbulkan oleh bakteri *A. hydrophila* terhadap kinerja organ hati ikan lele afrika serta sebagai referensi ilmu pengetahuan untuk pengembangan penelitian yang terkait di masa yang akan datang.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana perubahan gambaran histopatologi organ hati ikan lele afrika (*C. gariepinus*) yang dipengaruhi oleh patogenitas bakteri *A. hydrophila* ?
2. Bagaimana perubahan indeks parameter kimia darah fungsi organ hati ikan lele afrika (*C. gariepinus*) yang dipengaruhi oleh patogenitas bakteri *A. hydrophila* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Untuk menganalisis perubahan gambaran histopatologi organ hati ikan lele afrika (*C. gariepinus*) yang dipengaruhi oleh patogenitas bakteri *A. hydrophila*.
2. Untuk menganalisis perubahan indeks parameter kimia darah fungsi organ hati ikan lele afrika (*C. gariepinus*) yang dipengaruhi oleh patogenitas bakteri *A. hydrophila*.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberi pengetahuan baru terkait kerusakan dan gangguan fungsi organ hati ikan lele afrika (*C. gariepinus*) secara komprehensif yang ditimbulkan oleh patogenitas bakteri patogen *A. hydrophila*, membantu menentukan strategi pengobatan yang lebih efisien dan ramah lingkungan serta sebagai bacaan dan referensi ilmu pengetahuan untuk pengembangan penelitian yang terkait di masa yang akan datang.

1.5 Hipotesis

1. Ada perubahan pada gambaran histopatologi organ hati ikan lele afrika (*C. gariepinus*) yang telah dipengaruhi oleh patogenitas bakteri *A. hydrophila*.
2. Ada perubahan pada indeks parameter kimia darah fungsi organ hati ikan lele afrika (*C. gariepinus*) yang telah dipengaruhi oleh patogenitas bakteri *A. hydrophila*.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November-Desember 2024 di Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan, Laboratorium Produktivitas dan Kualitas Air, Laboratorium Teknologi Pembenihan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin Makassar serta Laboratorium Patologi dan Patologi Klinik Rumah Sakit Hewan Universitas Hasanuddin Makassar.

2.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang artinya dalam penelitian ini peneliti memberikan perlakuan tertentu terhadap sampel yang akan diujikan yaitu ikan lele afrika (*C. gariepinus*) untuk mendapatkan hasil dari penelitian ini. Perlakuan yang diberikan yaitu beberapa kelompok sampel akan diberikan larutan bakteri *A. hydrophila* dengan konsentrasi yang berbeda, sedangkan kelompok sampel yang lainnya (kontrol) tidak diberikan diberikan larutan bakteri *A. hydrophila*.

2.3 Materi Penelitian

2.3.1 Alat

2.3.1.1 Pemeliharaan ikan lele Afrika

Alat yang digunakan untuk memelihara ikan lele afrika dan memeriksa kualitas air dalam proses penelitian adalah aquarium 12 buah, aerator, selang plastik sipon, pH meter, termometer, DO meter dan amonia test kit.

2.3.1.2 Nekropsi dan pengambilan darah

Alat yang digunakan untuk nekropsi ikan lele afrika adalah gunting bedah, pisau bedah, pinset surgis, pinset anatomis, *handscoen* serta spuit 1 cc 12 buah untuk pengambilan darah.

2.3.1.3 Pengenceran bertingkat dan injeksi bakteri

Alat yang digunakan untuk pengenceran bertingkat bakteri adalah *Eppendorf* dan mikropipet serta spuit 1 cc 90 buah untuk menginjeksi bakteri kedalam ikan lele afrika.

2.3.1.4 Histopatologi

Alat yang digunakan untuk membuat preparat dan pengamatan histopatologi adalah mikroskop, kamera optilab, penggaris, spuit, botol sampel, kertas label, tisu, pinset, *tissue cassette*, *blade*, *water bath*, gelas ukur, seperangkat alat untuk

dehidrasi sampel, seperangkat alat untuk pewarnaan hematoksin-eosin (HE), *object glass*, kuas kecil, *cover glass*, inkubator, mikrotom dan pisau mikrotom.

2.3.1.5 Analisis kimia darah

Alat yang digunakan untuk analisis kimia darah adalah sentrifus, tabung serum, alat SMT-120VP *Veterinary Automatic Biochemical Analyzer* dan rotor 10 parameter fungsi hati 12 buah dari Seamaty.

2.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan lele afrika (*C. gariepinus*) 100 ekor, isolat bakteri *A. hydrophila*, larutan KMnO_4 , garam, air sebagai media pemeliharaan, *ethanol* 70%, formalin 10%, alkohol berseri (70%, 80%, 90%, 95% dan 100%), *xylol*, parafin, aquades, pewarna hematoksin-eosin (HE) dan media *plate count agar* (PCA).

2.4 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan dalam penelitian ini dilakukan dengan 4 perlakuan dimana menggunakan bakteri *A. hydrophila* sebagai intervensi dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 10^2 , 10^4 dan 10^6 CFU/ml dan 1 perlakuan kontrol tanpa diberi bakteri. Setiap perlakuan diulangi sebanyak 3 kali sehingga total unit percobaan adalah 12 dengan 6 ekor ikan lele afrika pada setiap 1 unit percobaan. Adapun rancangan percobaannya adalah sebagai berikut :

Perlakuan K : Tanpa diberi injeksi bakteri

Perlakuan A : Pemberian injeksi bakteri 10^2 CFU/ml

Perlakuan B : Pemberian injeksi bakteri 10^4 CFU/ml

Perlakuan C : Pemberian injeksi bakteri 10^6 CFU/ml

Setelah melakukan percobaan maka dilakukan pengujian terhadap parameter uji yaitu histopatologi dan analisis kimia darah, kemudian dari hasil yang didapatkan dilakukan analisis dan kajian teori serta uji statistik dengan bantuan aplikasi SPSS.

2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Kode Etik Penggunaan Hewan Uji

Persetujuan dan perizinan untuk menggunakan hewan uji yaitu ikan Lele afrika (*C. gariepinus*) diperoleh dari Komisi Etik Hewan dan Penelitian Rumah Sakit Hewan Universitas Hasanuddin Makassar, Indonesia. Semua metode yang digunakan dalam penelitian ini harus dilakukan sesuai dengan pedoman etik yang disepakati.

2.5.2 Pemilihan Sampel dan Pengelompokan Perlakuan

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan lele afrika (*C. gariepinus*) yang diperoleh dari UPT Balai Benih Ikan Parang Tambung kota Makassar. Ikan yang diambil memperhatikan beberapa faktor yaitu strain, umur dan ukuran yang

seragam untuk menjaga kualitas individu ikan serta kesesuaian antara perlakuan dan hasil dari penelitian yang dilakukan. Ikan yang digunakan dalam penelitian ini berumur 70-80 hari dengan ukuran 20-25 cm.

Perlakuan yang digunakan adalah 4 perlakuan dengan 3 pengulangan. Jumlah minimal sampel yang digunakan sesuai dengan rumus Federer (1977) untuk mendapatkan data yang valid.

$$(n - 1)(t - 1) \geq 15 \quad (1)$$

Keterangan :

n = Jumlah sampel, t = Jumlah kelompok/ perlakuan

Dalam penelitian ini terdapat 4 perlakuan dimana 1 perlakuan pada kelompok kontrol dan 3 perlakuan pada kelompok pemberian larutan bakteri *A. hydrophila*. Maka nilai t yang digunakan adalah 4. Bila dimasukkan pada rumus di atas, maka dapat ditentukan jumlah sampel per perlakuan yaitu :

$$(t-1) \times (n-1) \geq 15$$

$$(4-1) (n-1) \geq 15$$

$$3 (n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n = 18$$

$$n = \frac{18}{3}$$

$$n = 6$$

Berdasarkan hasil jumlah dari rumus tersebut maka jumlah minimal sampel per perlakuan adalah 6, sedangkan menurut Khairuman dan Amri (2012), padat tebar standar ikan lele adalah 500 ekor/m³, artinya jika dikonversi dalam bentuk yang sederhana maka ikan lele yang berjumlah 5 ekor dapat ditebar dalam 10 liter air (2 liter/ekor) dan dengan ukuran wadah pemeliharaan yang dapat menampung 12 liter air maka digunakan 6 ekor ikan lele afrika dalam satu wadah perlakuan. Untuk menjaga reliabilitas maka dilakukan replikasi sebanyak 3 kali, sehingga jumlah keseluruhan sampel yang dibutuhkan yaitu (4 x 6) x 3 (jumlah replikasi yang dilakukan) = 120 ekor ikan lele afrika (*C. gariepinus*).

2.5.3 Kontrol Eksperimen

2.5.3.1 Sterilisasi wadah

Untuk memastikan wadah eksperimen steril dilakukan pencucian bak dengan sabun, lalu dibilas dengan air bersih dan bagian dalam direndam dengan cairan kalium permanganat (KMnO₄) 25 ppm selama 24 jam agar bak steril dari patogen, kemudian bak dibilas dan dikeringkan selama 1 hari (Asniatih et al., 2013). Kemudian bak di isi dengan air sampai memenuhi standar volume minimal per individu ikan afrika lele yaitu 1 ekor/Liter dan dipasang aerasi (Fitriyanti et al., 2020). Bak di isi 6 ekor ikan uji sesuai dengan kebutuhan eksperimen perlakuan.

2.5.3.2 Kualitas air dan pengelolaan limbah eksperimen

Pengamatan kualitas air dilakukan 2 kali sehari (pagi-siang dan sore-malam) untuk memperkecil pengaruh lingkungan yang buruk terhadap hewan uji dengan melihat 4 parameter yakni Suhu (C°) dengan kisaran 14-38 (Prescod, 1973), pH 6,5 - 8,5 (Boyd, 1982), DO (mg/l) >3 (Khairuman dan Amri, 2002) dan Amoniak (mg/l) $\leq$ 0,2 (Effendi, 2003). *Treatment* dan penggantian air dilakukan ketika nilai dari keempat parameter kualitas air tersebut mendekati ambang batas dari rentang kisaran yang telah ditentukan sesuai literatur. Limbah eksperimen seperti alat, bahan habis pakai dan air bekas pemeliharaan dipisahkan berdasarkan jenisnya dan diproses sesuai dengan Peraturan Pemerintah RI Nomor 101 Tahun 2014 tentang Pengelolaan Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun.

2.5.4 Aklimatisasi Hewan Uji

Hewan uji yaitu Ikan lele afrika yang baru datang direndam terlebih dahulu dalam larutan garam 30 ppt selama kurang lebih 5 menit. Perendaman ini dilakukan untuk melepaskan ektoparasit yang menempel. Kemudian ikan di pindahkan ke bak uji. Masa pemeliharaan diawali dengan mangadaptasikan ikan terhadap lingkungannya yang baru selama 3 - 7 hari (Asniatih et al., 2013). Pemberian pakan dilakukan dua kali sehari dengan pakan komersial sebesar 3% dari berat badan selama tujuh hari aklimatisasi dan tujuh hari perlakuan inti.

2.5.5 Preparasi Isolat Bakteri

Isolat bakteri yang digunakan yaitu *A. hydrophila* yang berasal dari Balai Budidaya Air Payau Takalar (BBAPT). Kemudian bakteri diremajakan dalam media cair *Tryptic soy broth* selama 24 jam lalu perhitungan konsentrasi bakteri dilakukan dengan metode *total plate count* (TPC). Adapun prosedurnya merujuk pada Damayanti et al. (2024):

Preparasi sampel disiapkan 4 tabung reaksi yang masing-masing telah di isi dengan 9 ml NaCl 0,85%. Diambil 1 ml sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam 9 ml larutan NaCl 0,85% (pengenceran 10-1). Dari suspensi pengenceran 10-1 dipipet 1 ml ke dalam tabung reaksi 9 ml NaCl 0,85% (pengenceran 10-2). Dibuat pengenceran selanjutnya hingga pengenceran 10-4 kemudian di lakukan plating pada pengenceran 10-3 dan 10-4. Pengambilan masing-masing 0,5 ml sampel dari tiap pengenceran dan ditanam dalam media PCA yang telah di sterilkan, inkubasi selama 2-3 hari suhu 30-32° dengan posisi terbalik dan jumlah koloni yang tumbuh diamati serta dihitung.

Selanjutnya untuk memperoleh dosis perlakuan yang diinginkan yaitu 10^2 , 10^4 dan 10^6 CFU/ml maka dilakukan pengenceran berseri dengan menggunakan *eppendorf* dan mikropipet secara aseptik (Utami, 2009). Pemilihan dosis tersebut berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa LD50 bakteri *A. hydrophila* pada ikan lele adalah $10^{5,4-5,5}$ CFU/ml menurut Angka (2005)

dan 10^6 CFU/ml menurut Adrianti (2023) dalam 7 hari sehingga diambil angka bawah, tengah dan atas yang mewakili dosis ringan, sedang dan berat.

2.5.6 Penanaman Bakteri dan Pengamatan pada Hewan Uji

Penanaman bakteri dilakukan dengan cara menginjeksi suspensi bakteri sebanyak 0,1 ml/individu ikan uji melalui *intramuscular* (IM) agar penyebaran bakteri lebih cepat terjadi dikarenakan bakteri ini bersifat *septicaemia* sehingga lebih cepat dibandingkan dengan metode perendaman, pemberian pakan dan injeksi *intraperitoneal* (Hardi et al., 2014). Pengamatan pada semua kelompok perlakuan dilakukan selama 7 hari atau sampai terjadi kematian 50% pada kelompok perlakuan dengan injeksi konsentrasi bakteri tertinggi agar dapat dilakukan pengambilan darah ke sampel yang masih hidup. Setelah dilakukan pengambilan darah dari setiap sampel yang mewakili perlakuan maka dilakukan nekropsi lalu diambil organ target yaitu hati untuk dibuat sediaan histologi.

2.5.7 Pembuatan Preparat dan Analisis Histopatologi

Untuk melihat kerusakan jaringan yang terjadi pada hati ikan lele afrika (*C. gariepinus*) terlebih dahulu dilakukan pembuatan preparat histopatologi di Laboratorium Patologi Rumah Sakit Hewan Universitas Hasanuddin, Makassar. Pembuatan preparat histopatologi mengacu pada Jabbar et al. (2021) :

1. Fiksasi

Dasar dari pembuatan preparat histopatologi yang baik dimulai dengan melakukan fiksasi terhadap organ sampel dengan cara dimasukkan dalam larutan formalin 10% selama 2 hari. Volume larutan formalin 10% minimal 10 kali volume jaringan.

2. *Trimming*

Selanjutnya organ yang telah difiksasi jaringannya dipotong dengan arah potongan yang sesuai agar menghasilkan tampilan gambar histologi yang diinginkan lalu dimasukkan ke dalam *tissue cassette*.

3. *Processing* dan *embedding*

Selanjutnya dilakukan *processing* dengan memasukkan *tissue cassette* ke dalam *tissue processor*. Jaringan yang ada dalam *tissue cassette* kemudian didehidrasi dengan memasukkan jaringan ke dalam larutan alkohol bertingkat yaitu alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. Alkohol 70% sampai 80% masing-masing selama 1 hari. Kemudian 90% dan 95% masing-masing 12 jam. Selanjutnya 100% (1) dan 100 % (2) masing masing 1 jam. Kemudian *clearing* ke dalam *xylol* I dan *xylol* II, masing-masing selama 15 menit. Kemudian tahap *infiltrating* yaitu *tissue cassette* dimasukkan ke dalam paraffin cair I dan II dengan suhu 56°C masing - masing selama 1 jam. Tahapan selanjutnya adalah *embedding* yaitu mencetak jaringan dalam paraffin cair dengan cara spesimen diletakan di atas cetakan lalu diisi dengan paraffin. Posisi spesimen yang akan dipotong harus menghadap ke bawah menempel pada cetakan. Kemudian diletakkan *tissue cassette* diatas cetakan dan ditambahkan paraffin.

4. Pemotongan

Setelah preparat sudah bisa dipotong maka dilakukan pemotongan dengan mikrotom dengan ketebalan 5 μ m. Potongan jaringan kemudian ditaruh pada *slide* yang telah diberi aquades dan penomoran. Kemudian *slide* ditaruh di dalam inkubator bersuhu 40° C selama 1 hari sebelum diberikan pewarnaan.

5. Pewarnaan

Jaringan direndam ke dalam larutan *xylo* I selama 30 menit kemudian direndam ke dalam larutan *xylo* II selama 30 menit, lalu dimasukkan ke dalam alkohol 100% I, 100% II, 95%, 80% dan 70% secara berurut masing-masing selama 1 menit. Selanjutnya direndam ke dalam aquades selama 15 menit agar pewarnaan *haematoxylineosin* dapat menempel dengan baik. Kemudian dilanjutkan dengan memasukkan sediaan ke dalam larutan pewarna *eosin* selama 10 menit. Langkah berikutnya adalah sediaan dimasukkan ke dalam larutan alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100%, *xylo* I, dan *xylo* II secara berurut masing-masing selama 1 menit kecuali *xylo* I dan II masing-masing 30 menit. Setelah itu sediaan dikeringkan dan diberi perekat entelan 1-2 tetes, lalu ditutup dengan kaca penutup dengan hati-hati hingga tidak ada gelembung udara yang terbentuk, lalu disimpan selama beberapa menit sampai zat perekat mengering dan siap diamati dengan mikroskop.

Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop, menggunakan perbesaran lensa subjektif 10x dan lensa objektif 4x, 10x, dan 40x. Pengamatan dan pengambilan gambar dilakukan dengan menggunakan kamera mikroskop *optilab advanced*. Setelah itu, gambaran histopatologi jaringan hati ikan lele afrika (*C. gariepinus*) dianalisis dan diproses menggunakan aplikasi image J.

2.5.8 Analisis Kimia Darah

Kimia darah berperan penting dalam patologi klinis. Analisis kimia darah memberikan diagnostik yang akurat untuk memprediksi status kesehatan spesies ikan yang dibudidayakan salah satunya melalui parameter kimia darah fungsi hati (Fazio, 2019).

Analisis kimia darah ikan lele afrika (*C. gariepinus*) dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Hewan Universitas Hasanuddin, Makassar. Proses analisis kimia darah pada ikan yang dilakukan mengacu pada buku panduan alat dari SMT-120VP *Veterinary Automatic Biochemical Analyzer*, Seamaty (2021) :

1. Sampel darah ikan yang telah diambil dimasukkan ke dalam tabung serum lalu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit sehingga menghasilkan serum, setelah itu gunakan mikropipet untuk mengambil serum sebanyak 100 μ l untuk dimasukkan ke dalam rotor kimia darah dengan spesifikasi untuk menguji 10 parameter fungsi hati yaitu ALB, TP, TB, ALP, TC, TBA, AST, GGT, ALT dan GLOB.

2. Rotor yang sudah dimasukkan serum ikan lele afrika (*C. gariepinus*) ke dalamnya dimasukkan ke dalam alat analisis kimia darah SMT-120VP Seamaty. Analisis kimia darah pada alat diatur menyesuaikan dengan jenis spesies dari

sampel yang akan dianalisis. Kemudian hasil analisis kimia darah akan ditampilkan setelah 12 menit.

2.5.9 Analisis Statistik Data

Data dianalisis menggunakan perangkat lunak statistik SPSS. Normalitas terlebih dahulu diuji menggunakan uji Shapiro–Wilk. Untuk data yang berdistribusi normal, dilakukan analisis one-way ANOVA, sedangkan data yang tidak berdistribusi normal dianalisis menggunakan uji non-parametrik Kruskal–Wallis. Untuk variabel yang menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$), dilakukan analisis *post hoc* menggunakan uji LSD untuk ANOVA dan uji Mann–Whitney U untuk Kruskal–Wallis (McCormick dan Salcedo, 2017).